

GENERALIDADES SOBRE LA HEMATOLOGÍA DE ANFIBIOS ANUROS

Cabagna Zenklusen, M.C - Lajmanovich, R. C -
Attademo, A. M - Peltzer, P. M -
Junges, C. M. - Fiorenza Bincucci, G. -
Basso, A.



Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino"
Ministerio de Innovación y Cultura/Educación

Primera Junta 2859 – CP 3000, Santa Fe, Argentina
ameghino@santafe-conicet.gov.ar



Gobierno de Santa Fe

Generalidades sobre la hematología de anfibios anuros.

Cabagna Zenklusen, M.C.¹; Lajmanovich, R.C.^{1,2}; Attademo, A.M.^{1,2}; Peltzer, P.M.^{1,2}; Junges, C.M.^{1,2}; Fiorenza Bincucci, G.¹; Bassó, A.¹

¹ Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB-UNL), Cátedra de Ecotoxicología. Paraje "El Pozo" s/n. CP 3000 Santa Fe, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Av. Rivadavia 1917. CP C1033AAJ. Buenos Aires, Argentina

Resumen: En el presente trabajo se presenta generalidades de la constitución de la sangre de anfibios, base fundamental de la tesis doctoral titulada: "Caracterización hematológica de especies de anfibios anuros con distribución en los ecosistemas del litoral fluvial argentino (Provincias de Entre Ríos y Santa Fe). Potencialidad de su utilización como biomarcadores" (FBCB-UNL), señalando algunos de los resultados de la caracterización hematológica de individuos (larvas y adultos) de quince especies pertenecientes a cinco de las seis familias de anfibios anuros con distribución en las áreas riparias del río Paraná.

Palabras claves: anuros, eritrocitos, leucocitos, trombocitos, hemoparásitos, biomarcadores

Resume: This current work exhibits generalities of blood constitution in amphibians, which were a fundamental part of the doctoral thesis: "Hematological characterization of amphibian anuran species with distribution in the fluvial littoral ecosystems in Argentina (Provinces of Entre Ríos and Santa Fe) and their potencial use as biomarkers" (FBCB-UNL), where some of the results of the hematological characterization of individuals, both larvae and adults, of fifteen species belonging to five of the six amphibian anuran families with distribution in the riparian areas of Paraná River are pointed out.

Key words: anura, erythrocytes, leukocytes, thrombocytes, hemoparasites, biomarkers.

Introducción:

La respuesta originada en los organismos en diferentes niveles, ya sean, moleculares, celulares u orgánico, se puede evaluar mediante la alteración de algunos parámetros estructurales y funcionales, denominados biomarcadores. Entre estos, los no destructivos (en los cuales no es necesario sacrificar al individuo para la toma de muestra) han recibido especial atención en los programas de monitoreo biológico (McCarthy y Shugart, 1990; Lagadic y col., 1994; Walker, 1998; Sánchez-Hernández, 2001; 2003; Venturino y col., 2003, 2005; Vasseur y Cossu-Leguille, 2003; Lajmanovich y col., 2004; Attademo, 2010) debido a que pueden aplicarse en muestreos sucesivos a campo e inclusive, conocer estos parámetros en especies en vías de extinción o con escaso número de individuos.

Entre los distintos biomarcadores no destructivos utilizados los análisis hematológicos (hemograma y determinaciones químicas en plasma o suero) son unos de los más usados para la prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades en los seres humanos y en otras especies animales. Sin embargo, para poder utilizarlos como herramienta de diagnóstico ambiental en los anfibios es necesario conocer las características citológicas de los distintos elementos sanguíneos y determinar valores de referencia en las especies de anfibios anuros regionales.

En el presente trabajo se presenta generalidades de la constitución de la sangre de anfibios, base fundamental de la tesis doctoral de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral titulada: *“Caracterización hematológica de especies de anfibios anuros con distribución en los ecosistemas del litoral fluvial argentino (Provincias de Entre Ríos y Santa*

Fe). Potencialidad de su utilización como biomarcadores”, defendida el 1 de octubre de 2012, señalando algunos de los resultados de la caracterización hematológica de individuos (larvas y adultos) de quince especies pertenecientes a cinco de las seis familias de anfibios anuros con distribución en las áreas riparias del río Paraná (Peltzer y Lajmanovich, 2007).

Sangre de los anfibios: Circulación y composición.

La sangre es un tipo de tejido conjuntivo especializado constituido por una parte líquida, el plasma y otra, representada por los elementos formes. En contraste con otros vertebrados, los anfibios poseen diferentes mecanismos de respiración, lo que lleva a diferentes sistemas vasculares. En las larvas con respiración branquial, la circulación es similar a la de los peces. En los anuros adultos, la sangre venosa proveniente de los tejidos entra a la aurícula derecha, pasando al único ventrículo, ya que el corazón es tricavitario. Sale del mismo por el cono arterioso que impulsa la sangre hacia las arterias carótidas sistémicas y pulmonares. Estas últimas no solo llevan sangre a los pulmones, sino que también dan origen a algunas arterias cutáneas principales, llevando sangre hacia la piel, para el intercambio gaseoso. La sangre oxigenada proveniente de los pulmones regresa a la aurícula izquierda por la vena pulmonar y las que retornan de la piel se conectan con los vasos venosos sistémicos, mezclándose la sangre desoxigenada con la oxigenada (Turner, 1988; Hill y col. 2006).

En condiciones fisiológicas, el plasma está constituido por agua y cantidades variables de solutos inorgánicos (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^- , CO_3H^-) y orgánicos (proteínas, lípidos, hidratos de carbono y metabolitos, como urea,

ácido úrico, pigmentos y enzimas, entre otros). La cantidad relativa de cada uno de estos varía en función de la especie de vertebrado considerada y dentro de esta, según la edad, estado nutricional, peso y en animales poiquiloterms influye también la época del año de la toma de muestra. Otros factores que pueden establecer modificaciones son la época reproductiva y el estado de cautiverio o silvestre (Fudge, 2000a; Coppo, 2003). En lo que respecta a los anfibios, el color normal del plasma depende de las especies (Figura N°1), variando de levemente amarillento, verde o naranja (Barrio, 1965; Coppo, 2003; Coppo y col., 2005a,b; Allender y Fry, 2008; Heatley y Johnson, 2009).

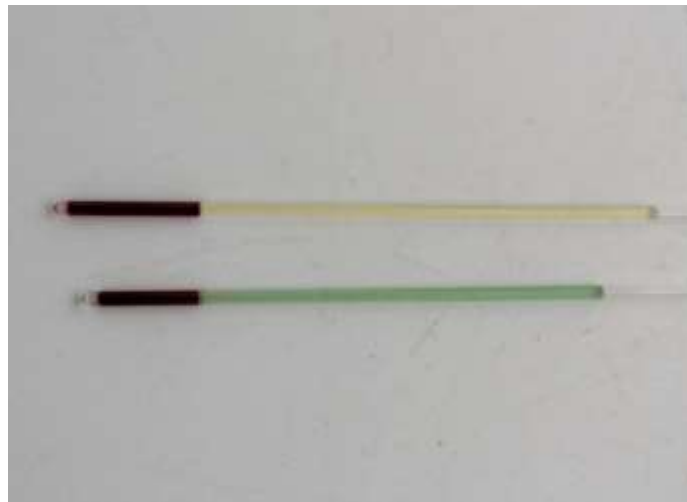


Figura N°1: Tubos de microhematocrito en los que se puede observar el plasma amarillento en *Leptodactillus latrans* (arriba) y verde, en *Trachycephalus typhonius* (abajo).

En los anfibios, como en otros vertebrados, los eritrocitos son las células más abundantes de la sangre y su función es la del transporte de oxígeno y dióxido de carbono hacia y desde los tejidos, respectivamente, a través de la unión de los mismos con la hemoglobina. Tienen forma ovalada, son delgados, con una protrusión central debida al núcleo. Al microscopio óptico y con coloraciones de rutina, su citoplasma es homogéneo, debido a que está

constituido fundamentalmente por hemoglobina (Figura N°2). Mientras que su tamaño es variable según la especie y la edad o estadio del individuo, el sexo del anuro no influiría (Singh, 1977a; Atatür y col., 1999).

La existencia de núcleo y la capacidad de los eritrocitos de dividirse en sangre, incorpora un aspecto a tener en cuenta en la evaluación de la morfología sanguínea: la presencia o no de alteraciones nucleares. Dentro de éstas, la más ampliamente utilizada para la evaluación de daño cromosómico, es la generación de micronúcleos. Como su nombre lo indica, son masas de cromatina con forma de pequeños núcleos que pueden originarse de manera espontánea o como respuesta a la acción de determinados xenobióticos (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Zuniga y col., 1996).

En la mayoría de las especies es posible observar hematíes anucleados (eritroplástidos), de tamaño y forma variables en baja cantidad (1 - 3% de los hematíes), constituyendo excepciones algunas especies de la tribu Bolitoglossini (salamandras sin pulmones) en el que el número de eritroplástidos puede ser de 80 a 95 % de las células circulantes (Villolobos y col., 1988; Glomski y col., 1997).

Otros tipos celulares que se pueden diferenciar en sangre son los leucocitos. Bajo este nombre se agrupan una serie de células que pueden dividirse en dos grandes grupos, granulocitos y agranulocitos, según la presencia o no de granulaciones específicas. Dentro de los primeros se consideran los neutrófilos, heterófilos, eosinófilos y basófilos, nombrados de esta forma por la afinidad tintorial de sus granulaciones, mientras que los segundos comprenden linfocitos, monocitos y azurófilos, que pueden llegar a tener, en algunos casos, granulaciones inespecíficas. En anfibios, se utiliza la

semejanza morfológica con las células de otras especies para clasificar los distintos tipos leucocitarios (Figura N°2). En la mayoría de las especies de este grupo de vertebrados, los linfocitos son las células que se encuentran en mayor cantidad. Como en el caso de los eritrocitos, se encontraron variaciones relacionadas con la especie, sexo, edad, estado fisiológico de los individuos y estación del año (Varela y Sellares, 1937b; 1938; Singh, 1977b; Wojtaszek y Adamowicz, 2003; Forbes y col. 2006; Zhelev, 2007; Gül y col., 2011).

A diferencia de los mamíferos, en peces, anfibios, reptiles y aves, los elementos formes participantes de la hemostasia y en la coagulación de la sangre, son células (Figura N°2), denominadas trombocitos (Levin, 2007). Pueden presentarse semejantes a los linfocitos pequeños, pero con citoplasma incoloro, o con forma de huso (Turner, 1988; Canfield, 1998; Claver y Quaglia, 2009). Si bien su función esencial es la de intervenir en la hemostasia, también se demostró la capacidad de fagocitar partículas de carbón (Claver, 2005).

Otras células que se pueden encontrar en los extendidos sanguíneos, en baja proporción, son las células con pigmento (Clark y col., 1936; Mitsui, 1965; Wassermann, 1965b; Pessier, 2007), macrófagos y células precursoras, fundamentalmente eritrocíticas (Varela y Sellares, 1937a,b; 1938; Glomski y col., 1997; Cianciarullo y col., 2000a). Las primeras fueron señaladas en anfibios, reptiles y humanos, como participantes en el transporte de melanina hacia hígado y bazo y como melano-macrófagos en anfibios, mientras que la observación de macrófagos (con leucocitos y eritrocitos fagocitados) señalaría el tejido sanguíneo interviene en la hemocatéresis, como así también en la hematopoyesis, por la observación de células precursoras. (Varela y Sellares, 1937a,b; 1938; Varela y Mancini, 1938; Glomski y col., 1997; Cianciarullo y col., 2000a; De Abreu Manso y col., 2009).

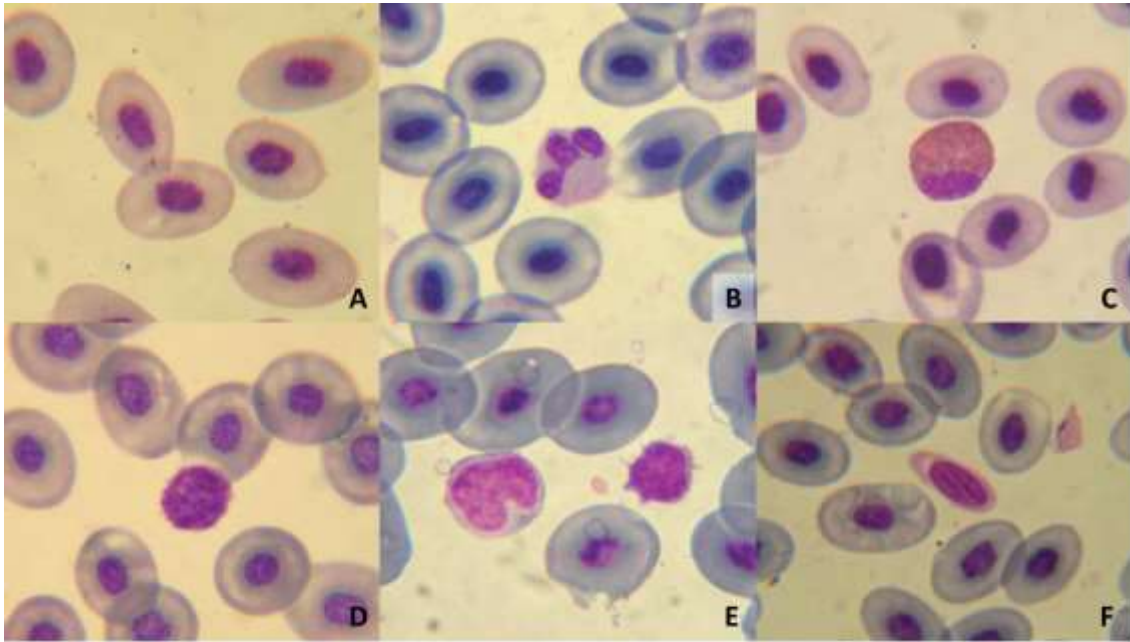


Figura N°2: Células sanguíneas de anfibios anuros. A: Eritrocitos de larvas de *Elachistocleis bicolor*, B: granulocito neutrófilo de adulto de *T. typhoni*, C: granulocito eosinófilo de *Leptodactylus mystacinus*, D: granulocito basófilo de adulto de *Rhinella fernandezae*, E: monocito (izq.) y linfocito (der.) de adulto de *Rhinella arenarum*, F: trombocito en adulto de *Leptodactylus latrans*. May Grünwald Giemsa. 100x

Inclusiones citoplasmáticas y hemoparásitos.

Los anuros, al estar expuestos a numerosos vectores hematófagos pueden ser infectados por bacterias, virus y hemoparásitos extra- e intracelulares. En la mayoría de los casos las infecciones son por uno o más parásitos, silentes y su hallazgo en sangre es accidental (Wright, 2001; Pessier, 2007; Leal y col., 2009).

Dentro de las inclusiones citoplasmáticas relacionadas con bacterias se consideran las debidas a *Rickettsias* y las virales. Como ocurre con las infecciones bacterianas, los estudios de caracterización y clasificación taxonómica son incompletos, colocando la mayoría de estos virus dentro de las familias Iridoviridae y Herpesviridae (Gruia-Gray y col., 1989; Pessier, 2007; Marschang, 2011).

Una amplia variedad de hemoparásitos intra- y extracelulares que incluyen nematodos y protozoarios fueron observados en sangre e improntas de tejidos de anfibios. Dentro de los nematodos se incluyen varias especies englobadas bajo la denominación de microfilarias (Densmore y Green, 2007). Son cosmopolitas y en Argentina fueron observadas en el género *Leptodactylus* (Mazza y Franke, 1927; Schurmans Stekhovek, 1951), *R. fernandezae* (Cabagna y col., 2011) e *H. pulchellus* (Cabagna y col. datos no publicados, Figura N°3).

Tripanosomas y apicomplexos y dentro de estos, las hemogregarinas, se encuentran dentro de los protozoarios que con mayor frecuencia se pueden observar en extendidos sanguíneos de distintas especies de anfibios. A diferencia de los tripanosomas de los mamíferos, no existen parámetros taxonómicos claramente definidos para los de anfibios, peces y reptiles. Durante años se utilizaron características morfológicas, origen geográfico, tipo de hospedador, ciclo vital y características bioquímicas para su taxonomía, dando como resultado más de sesenta especies de las que solo siete pueden considerarse “especies verdaderas” (Desser, 2001; Martin y col., 2002; Ferreira, 2007; Leal, 2007; Leal y col., 2009).

En los anuros, Ferreira y col. (2007) señalan que la familia Leptodactylidae sería en la que se registra mayor prevalencia de tripanosomas, seguida por la Hylidae, luego, Leiuperidae y por último Bufonidae. También fue señalado que los anfibios acuáticos infectados con este tipo de hemoparásitos presentan mayor cantidad de formas (Desser, 2001). En concordancia con estos datos, en nuestros estudios, *Leptodactylus latrans* y *Leptodactylus chaquensis*, asociadas a cuerpos de agua durante su vida, presentaron mayor

prevalencia de tripanosoma que *Trachycephalus typhonius*. Asimismo, ésta solo registró una morfoespecie, mientras que *L. chaquensis*, cuatro (Cabagna Zenklusen, 2012).

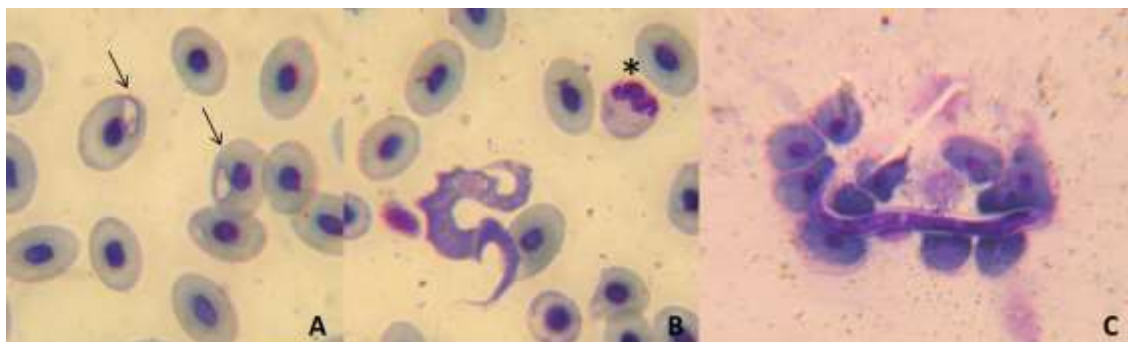


Figura N°3: Hemoparásitos hallados en anfibios anuros de nuestra zona. A: Hemogregarina en adulto de *L. latrans*, B: Trypanosoma sp. en adulto de *L. chaquensis*, C: microfilaria en adulto de *Hypsiboas pulchellus*. May Grünwald Giemsa. 100x.

Parámetros sanguíneos como biomarcadores en anfibios.

Para la evaluación sanguínea se parte de la premisa que las respuestas hematológicas de los anfibios son, por lo general, semejantes a las de otros vertebrados (Allender y Fry, 2008). Así, el componente leucocitario fue propuesto para la evaluación del sistema inmune inespecífico (Davis y col., 2010) de individuos expuestos a situaciones de stress (Davis y col., 2008; Davis y Maerz 2008, 2009), como parámetro indicativo de poblaciones provenientes de sitios contaminados (Cabagna y col., 2005; Barni y col., 2007; Zhelev, 2007) y como medida del efecto inmunomodulador de plaguicidas (Forson y Storfer, 2006).

Los cambios ambientales son capaces producir respuestas naturales, como las modificaciones cíclicas durante las estaciones del año, y la exposición a distintos contaminantes, desencadenar una serie de alteraciones sanguíneas que pueden llegar a reflejar su impacto orgánico. Así, Perú y col., 1998 y Chiesa

y col., 2006, determinaron variaciones hematológicas en *Rhinella arenarum* expuestos a metales pesados. Las variaciones en la morfología eritrocítica se asociaron a exposición de aminas aromáticas, metales y estrés (Krauter, 1993; Barni y col., 2007) y las dimensiones de los hematíes de *Pelophylax ridibundus* (diámetros máximos y mínimos celulares y nucleares) se utilizaron para el biomonitoreo de zonas contaminadas (Zhelev y col., 2006).

Asimismo, se observó, en larvas de tres especies distintas de anuros expuestas a efluentes industriales y en cultivos de arroz, el incremento de granulocitos eosinófilos, leucocitos considerados como un signo de protección frente a agentes tóxicos (Fiorenza Biancucci, 2009; Attademo y col., 2011; Attademo y col., 2013).

De lo antes expuesto se desprende que, a pesar que la evaluación hematológica en anfibios anuros puede ser compleja, es uno de los métodos más sencillos y menos invasivos que permiten la detección de cambios fisiológicos y patológicos de las poblaciones silvestres, relacionados con factores ambientales (Artacho y col., 2007; Barni y col., 2007; Davis y col., 2008).

Bibliografía:

- Allender, M.C. y Fry, M.M. (2008) *Amphibian Hematology*. Vet. Clin.Exot. Anim. 11: 463 - 480.
- Al-Sabti, K. y Metcalfe, C.D. (1995) *Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water*. Mutat. Res. 343: 121 - 135.
- Artacho, P.; Soto-Gamboa, M.; Verdugo, C. y Nespolo, R.F. (2007) *Using haematological parameters to infer the health and nutritional status of an endangered black-necked swan population*. Comp. Biochem. Physiol. 147: 1060-1066.

- Atatür, M.K., Arıkan, H. y Çevik, İ.E. (1999) *Erythrocyte sizes of some anurans from Turkey*. Turk. J. Zool. 23: 111 - 114.
- Attademo, A.M. (2010) *Diversidad de Anfibios (Amphibia: Anura) en Cultivos de Soja de la Republica Argentina: Implicaciones en el Control Biológico de Plagas*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. 173 p.
- Attademo, A.; Cabagna Zenklusen, M.; Lajmanovich, R.; Peltzer, P.; Junges, C. y Bassó, A. (2011) *B-esterase activities and blood cell morphology in the Frog Leptodactylus chaquensis (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina)*. Ecotoxicology 20: 274 - 282.
- Attademo, A.; Peltzer, P.; Lajmanovich, R.; Cabagna Zenklusen, M.; Junges, C. y Bassó, A. (2013) *Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina*. Environ Monit Assess DOI 10.1007/s10661-013-3404-z
- Barni, S.; Boncompagni, E.; Grosso, A.; Bertone, V.; Freitas, I.; Fasola, M.; Fenoglio, C. (2007) *Evaluation of Rana snk esculenta blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases*. Aquat. Toxicol. 81: 45 - 54.
- Barrio, A. (1965) *Cloricia fisiológica en batracios anuros*. Physis 25 (69): 137 - 142.
- Cabagna, M.; Lajmanovich, R.; Stringhini, G.; Sanchez-Hernandez, J.C.; Peltzer, P. (2005) *Hematological parameters of health status in the common toad Bufo arenarum in agroecosystems of Santa fe Province, Argentina*. App. Herpetol. 2 (4): 373 - 380.
- Cabagna M.; Lajmanovich, R.; Attademo, A.; Peltzer, P.; Junges, C.; Fiorenza, G. y Bassó A. (2011) *Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de Rhinella fernandezae (Amphibia, Anura) en ambientes del Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina*. Rev. Biol. Trop. 59 (1): 17 - 28.
- Cabagna Zenklusen, M. (2012) *Caracterización hematológica de especies de anfibios anuros con distribución en los ecosistemas del litoral fluvial argentino (Provincias de Entre Ríos y Santa Fe). Potencialidad de su utilización como biomarcadores*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. 223 p.
- Canfield, P.J. (1998) *Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals*. Aust. Vet. J. 76 (12): 793 - 800.
- Chiesa, M.E.; Rosenberg, C.E.; Fink, N.E. y Salibián, A. (2006) *Serum protein profile and blood cell counts in adult toads Bufo arenarum (Amphibia: Anura)*

- Bufonidae*): effects of sublethal lead acetate. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 50: 384 - 391.
- Cianciarullo, A.M.; Bertho, A.L. y Meirelles, M.D. (2000a) *Mitochondrial kinetics during amphibian erythropoiesis related to haeme synthesis*. Cell Biol. Int. 24:183 - 192.
- Clark, E.R.; Clark, E.L. y Rex, R.O. (1936) *Observations on polymorphonuclear leukocytes in the living animal*. Am. j. anat. 59 (1): 123 - 173.
- Claver, J.A. y Quaglia, A. (2009) *Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates*. J. Exotic Pet Medicine 18 (2): 87 - 97.
- Coppo, J.A. (2003) *El medio interno de la "rana toro" (Rana catesbeiana, Shaw 1802). Revisión bibliográfica*. Rev. Vet. 14 (1): 25 - 41.
- Coppo, J.A.; Mussart, N.B.; Fioranelli, S.A. y Zeinsteger, P.A. (2005a) *Blood and urine physiological values in captive bullfrog, Rana catesbeiana (Anura: Ranidae)*. Analecta Vet. 25: 15 - 17.
- Coppo, J.A.; Mussart, N.B.; Fioranelli, S.A.; Barboza, N.N. y Koza, G.A. (2005b) *Variaciones fisiológicas atribuibles al crecimiento, alimentación y temperatura ambiental en sangre de Rana catesbeiana (Shaw, 1802)*. Rev. Vet. 16: (2) 74 - 83.
- Davis, A.K., D.L. Maney y J.C. Maerz. (2008) *The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists*. Fun. Ecol. 22: 760 - 772.
- Davis, A.K. y Maerz, J.C. (2008) *Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, Ambystoma talpoideum*. Copeia (3): 613 - 617.
- Davis, A.K. y Maerz, J.C. (2009) *Effects of larval density on hematological stress indices in salamanders*. J. Exp. Zool. 311A: 1 - 8.
- Davis, A.K. y Durso, A.M. (2009) *White blood cell differentials of northern cricket frogs (Acris c. crepitans) with a compilation of published values from other amphibians*. Herpetologica, 65(3): 260 - 267.
- Davis, A.K.; Keel, M.K.; Ferreira, A. y Maerz, J.C. (2010) *Effects of chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (Rana catesbeiana)*. Comp. Clin. Pathol. 19: 49 - 55.
- De Abreu Manso, P.P.; de Brito-Gitirana, L. y Pelajo-Machado, M. (2009) *Localization of hematopoietic cells in the bullfrog (Lithobates catesbeianus)*. Cell Tissue Res. 337(2): 301 - 312.
- Densmore, C.L. y Green, D.E. (2007) *Diseases of Amphibians*. ILAR Journal 48 (3): 235 - 254.

- Desser, S.S. (2001) *The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes*. J. Parasitol. 87: 152-160.
- Ferreira, R.C. (2007) *Diversidade e filogenia de tripanossomas de anuros*. Tesis Doctoral. 127 p.
- Ferreira, R.C.; Campaner, M.; Viola, L.B.; Takata, C.S.A; Takeda, G.F.; Teixeira, M.M.G. (2007) *Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from Amazonia, Atlantic forest and Pantanal biomes in Brazil*. Parasitology 1 - 16.
- Fiorenza Biancucci, G.S. (2009) *Herramientas para la gestión ambiental del arroyo "Las Tunas" en su trayecto por el parque industrial "General Belgrano" de la ciudad de Paraná, Entre ríos, Argentina*. Tesis para la obtención del grado de Magíster en Gestión Ambiental, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas. 95 p.
- Forbes, M.R.; McRuer, D.L. y Shutler, D. (2006) *White blood cell profiles of breeding American toads (Bufo americanus) relative to sex and body size*. Comp. Clin. Pathol. 15: 155 - 159.
- Forson, D. y Storfer, A. (2006) *Effects of atrazine and iridovirus infection on survival and lifehistory traits of the long-toed salamander (Ambystoma macrodactylum)*. Environ. Toxicol. Chem. 25: 168 - 173.
- Fudge, A. (2000a) *Avian blood sampling and artifact considerations*. En: *Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets*. (Ed. Fudge, A) W.B. Saunders Company, Filadelfia, Estados Unidos, p. 1 - 8.
- Glomski, C.A.; Tamburlin, J.; Hard, R. y Chainani M. (1997) *The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians*. Histol.Histopathol. 12: 147 - 170.
- Gruia-Gray, J.; Petric, M. y Desser, S.S. (1989) *Ultrastructural, biochemical and biophysical properties of an erythrocytic virus of frogs from Ontario, Canada*. J. Wildl. Dis. 25(4): 497 - 506.
- Gül, Ç.; Tosunoğlu, M.; Erdoğan, D. y Özdamar, D. (2011) *Changes in the blood composition of some anurans*. Acta Herpetologica 6(2): 137 - 147.
- Heatley, J.J. y Johnson, M. (2009) *Clinical Technique: Amphibian Hematology: A Practitioner's Guide*. J. Exotic. Pet. Med. 18 (1): 14 - 19.
- Hill, R.W; Wyse, G.A y Anderson, M. (2006) *Circulación*. En *Fisiología animal, Parte V: Transporte de oxígeno, dióxido de carbono y sustancias internas*. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, p. 725 - 762.
- Krauter, P.W. (1993) *Micronucleus incidence and hematological effects in bullfrog tadpoles (Rana catesbeiana) exposed to 2-acetylaminofluorene and 2-aminofluorene*. Arch. Environ. Contam.Toxicol. 24: 487 - 493.

- Lagadic, L.; Caquet, T. y Ramade, F. (1994). *The role of biomarkers in environmental assessment Invertebrate populations and communities*. Ecotoxicology 3: 193 - 208.
- Lajmanovich, R.C.; Sánchez-Hernández, J.C.; Stringhini, G. y Peltzer, P.M. (2004) *Levels of serum cholinesterase activity in the rococo toad (Bufo paracnemis) in agrosystems of Argentina*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72: 548–591.
- Leal, D.D.M. (2007) *Ocorrência de hemoparasitas dos Gêneros Trypanosoma (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) e hemogregarinas em Anuros dos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul*. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.
- Leal, D.D.M.; O'dwyer, L.H.; Ribeiro, V.C.; Silva, R.J.; Ferreira, V.L. y Rodrigues, R.B. (2009) *Hemoparasites of the genus Trypanosoma (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) and hemogregarines in anurans of the Sao Paulo and Mato Grosso do Sul States - Brazil*. An. Acad. Bras. Cienc. 81(2): 199 - 206.
- Levin, J. (2007) *The evolution of mammalian platelets*. En: *Platelets* (Michelson, A.D., ed.) Academic Press, Estados Unidos, 4 - 22.
- Marschang, R.E. (2011) *Viruses infecting reptiles*. Viruses 3: 2087 - 2126.
- Martin, D.S.; Wright, A.D.G.; Barta, J.R. y Desser, S.S. (2002) *Phylogenetic position of the giant trypanosomes Trypanosoma chanttoni, Trypanosoma fallisi, Trypanosoma mega, Trypanosoma neveulemairei, and Trypanosoma ranarum inferred from 18S rRNA gene sequences*. J. Parasitol. 88(3): 566 - 571.
- Mazza, S. y Franke, I. (1927) *Microfilarias de ranas (Leptodactylus ocellatus L.) del norte argentino*. Revista de la Universidad de Buenos Aires 5: 899 - 901.
- McCarthy, J. y Shugart, L. (1990) *Biological markers of environmental contamination*. En: *Biomarkers of environmental contamination* (McCarthy, J. y Shugart, L.; eds.). Lewis, Boca Raton, Florida, Estados Unidos. 3 - 14 p.
- Mitsui, T. (1965) *Histochemical studies on the distribution of enzymes, especially oxidases and phosphatases in the living body*. Final report En línea: <http://www.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/625955.pdf>
- Perí, S.I.; Fink, N.E. y Salibian, A. (1998) *Hematological parameters in Bufo arenarum injected with sublethal dose of lead acetate*. Biom. Environ. Sci. 11: 70 - 74.
- Pessier, A.P. (2007) *Cytologic diagnosis of disease in amphibians*. Vet. Clin. Exot. Anim. 10: 187 - 206.
- Sánchez-Hernández, J.C. (2001) *Wildlife exposure to organophosphorus insecticides*. Ev. Environ. Contam. Toxicol. 172: 21 - 63.

- Sánchez-Hernández, J.C. (2003) *Evaluating reptile exposure to cholinesterase-inhibiting agrochemicals by serum butyrylcholinesterase activity*. Environ. Toxicol. Chem. 22: 296 – 301.
- Schurmans Stekhovek, J.H. (1951) *Nematodos parásitos de anfibios, pájaros y mamíferos de la República Argentina*. Acta Zool. Lilloana 32: 315 - 400.
- Singh, K. (1977a) *Haematology of the common Indian frog Rana tigrina I. Erythrocytes*. Anat Anz. 141 (3): 280 - 284.
- Singh, K. (1977b) *Hematology of the common Indian Frog Rana tigrina. II. Leucocytes*. Anat Anz. 141 (5): 445 - 449.
- Turner, R.J. (1988) *Amphibians*. En *Vertebrate blood cells* (Rawley, A.F. y Ratcliffe, N.A. eds.). Cambridge University. Cambridge, Inglaterra, p. 129 - 209.
- Varela, M.E y Sellares M.E. (1937a) *Sobre la morfología hemática del Bufo arenarum (Hensel)*. Rev. Soc. Arg. Biol. 13 (8): 351 - 361.
- Varela, M.E y Sellares, M.E. (1937b) *Variaciones estacionales del cuadro hemático en el Bufo arenarum (Hensel)*. Rev. Soc. Arg. Biol. 13 (8): 412 - 416.
- Varela, M.E y Sellares, M.E. (1938) *Nuevas observaciones sobre las variaciones estacionales del cuadro hemático en el Bufo arenarum Hensel*. Rev. Soc. Arg. Biol. 14: 229 - 235.
- Varela, M.E y Mancini, R.E. (1938) *Sistema hemocitopoyético del Bufo arenarum (Hensel). Topografía, citología y observaciones sobre sus variaciones estacionales*. Rev. Soc. Arg. Biol, 14: 468 - 475.
- Vasseur, P. y Cossu-Leguille, C. (2003) *Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety*. Environ. Int. 28: 711 - 717.
- Venturino, A.; Rosenbaum, E.; Caballero de Castro, A.; Anguiano, O.L.; Gauna, L.; Fonovich de Schroeder, T. y Pechen de D'Angelo, A.M. (2003) *Biomarkers of effect in toads and frogs*. Biomarkers 8: 167–186.
- Venturino A. y Pechen de D'Angelo, A.M. (2005) *Biochemical targets of xenobiotics: Biomarkers in amphibian ecotoxicology*. Appl. Herpetol. 2: 335-354.
- Villolobos, M.; León, P.; Sessions, S.K. y Kezer, J. (1988) *Enucleated erythrocytes in plethodontid salamanders*. Herpetologica 44(2): 243 - 250.
- Walker, C.H. (1998) *The use of biomarkers to measure the interactive effects of chemicals*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 40: 65–70.
- Wassermann, H.P. (1965b) *Leukocytes and melanin pigmentation. Demonstration of pigmented leukocytes in blood of amphibians, reptiles and normal man*. J. Invest. Dermatol. 45(2): 104 - 109.

- Wright, K. (2001) *Amphibian hematology*. En: *Amphibian medicine and captive husbandry*. (Wright, K. y Whitaker, B., eds.). Krieger Publishing, Malabar, Florida, Estados Unidos, p. 129 - 146.
- Wojtaszek, J. y Adamowicz, A. (2003) *Haematology of the fire-bellied toad, Bombina bombina L.* Comp. Clin. Path. 12: 129 - 134.
- Zhelev, Z.M.; Angelov, M.V. y Mollov, I.A. (2006) *A study of some metric parameters of the erythrocytes in rana ridibunda (Amphibia: Anura) derived from an area of highly developed chemical industry*. Acta Zool. Bulg. 58(2): 235 - 244.
- Zhelev, Z.M. (2007). *Investigation on the blood differential formula in Rana ridibunda (Anura, Amphibia) from the Area of the Maritsa – Iztok 1 Steam Power Plant*. Acta Zool. Bulg. 59(2): 181 - 190.
- Zuniga, G.; Torres-Bugarin, O.; Ramirez-Munoz, M.P.; Ramos, A.; Fanti-Rodriguez, E.; Portilla, E.; Garcia-Martinez, D.; Cantu, J.M.; Gallegos-Arreola, M.P. y Sanchez-Corona, J. (1996) *Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species*. Mutat. Res. 369: 123 - 127.

IMPRESO EN LOS TALLERES GRÁFICOS
DE LA IMPRENTA OFICIAL DE LA
PROVINCIA DE SANTA FE
EN EL MES DE MARZO DE 2014
Av. Peñaloza 5385 (3000) - Santa Fe - Argentina
Tel/Fax (54) (0342) 4579242 - 4579235
Octubre 2012 - Depósito Ley 11723
Registro de Propiedad Intelectual
Nº 09108 - 1994
Depósito Legal Nº 11.723
Musco Provincial de Ciencias Naturales
“ Florentino Ameghino ”
Impreso en la República Argentina
Printed in Argentine